

На правах рукописи

Светлу —

ЛОМТЕВА
Светлана Витальевна

**Изучение роли аллантина в процессе
репродукции человека**

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2010

Работа выполнена в
Научно-исследовательском институте биологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южный федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шкураг Татьяна Павловна.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Губарева Любовь Ивановна;
доктор биологических наук
Криворучко Александр Юрьевич.

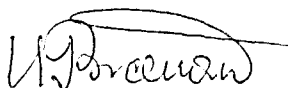
Ведущая организация: ГОУ ВПО «Ростовский государственный
медицинский университет» Росздрава РФ.

Защита диссертации состоится 29 сентября 2010 г.
в 14 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.09 при
Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1, корп. 2, комн. 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного университета.

Автореферат разослан 25 августа 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Рженаковский И.В.

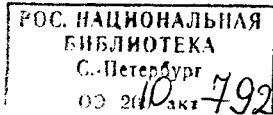
2007
19795

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Впервые аллантоин был найден в эмбриональных тканях птиц, отсюда и название – аллантоин (от «аллантоис» – одна из зародышевых оболочек). Аллантоин – $C_4H_6O_3N_4$ (диуренд глиоксиловой кислоты), один из продуктов обмена веществ, является низкомолекулярным гетероциклическим соединением. У большинства млекопитающих в клетках печени содержится уратоксидаза, которая катализирует окисление мочевой кислоты до аллантоина. В начале прошлого столетия, Виешовский (Wiechowski W., 1909) показал, что в отличие от других млекопитающих, человек и обезьяны выделяют не аллантоин, а мочевую кислоту как конечный продукт пуринового обмена. Сегодня известно, что восемь независимых мутаций гена уратоксидазы (Uox) отличают человека и гоминид (горилла, шимпанзе, орангутан и гиббон) от обезьян Старого Света (макаки, павианы, мандрилы), результатом этих мутаций явилась инактивация гена уриказы (Oda M. e.a., 2002). Вследствие этих Uox-мутаций конечным продуктом деградации пуринов в организме приматов является не аллантоин, а мочевая кислота, уровень которой в сыворотке крови человека более чем в 50 раз выше по сравнению с другими млекопитающими (Friedman T.B. e.a., 1985).

Аллантоин был обнаружен в небольших количествах в амниотической жидкости человека (Ueno D., 1917). Однако эти данные противоречили результатам авторитетного Виешовского не нашедшего аллантоин ни в моче новорожденных, ни в амниотической жидкости (Wiechowski W., 1910). Об аллантоине забыли практически на сто лет. Появление новых методов детекции аллантоина подняли из истории биохимии «забытую молекулу» и повышенные концентрации аллантоина у человека были обнаружены при различных состояниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса – при физических нагрузках (Guskov E.P. e.a., 1990; Mikami T. e.a., 2000; Rasasen L.A. e.a., 1993), при ревматоидном артрите (Yardim-Akaydin S. e.a., 2004), инфаркте миокарда (Kock R. e.a., 1994), синдроме Дауна (Zitnanova I. e.a., 2004). Взрыв исследований по окислительному стрессу в начале 90-х годов показал, что существует не только ферментативный способ образования аллантоина, но и что аллантоин может образовываться в результате атаки молекулы мочевой кислоты свободными радикалами кислорода (Andrews P., 1992; Legendijk J. e.a., 1995; Marklund N. e.a.2000; Ma S.W. e.a., 2004; Gruber J. e.a., 2009). Большой вклад в изучение антиоксидантных и антимуtagenных свойств аллантоина, исследование его как витаминopodobного регулятора многих биологических процессов у животных и растений, контролирующей клеточную пролиферацию, внес профессор Е.П. Гуськов (Гуськов Е.П. и др., 2001, 2002; Гуськов Е.П. и др., 2004) за что автор выражает ему особую благодарность и посвящает свою работу его светлой памяти.

Известно, что аллантоин обеспечивает жизнеспособность развивающегося эмбриона млекопитающих, и многие нарушения эмбриогенеза и патологические беременности у животных связаны с недостатком аллантоина (Wu X. e.a., 1994). С другой стороны эмбриональные и плацентарные клетки чувствительны



к окислительному стрессу (Burton G. J. e.a., 2003). Поэтому для исследования роли аллантаина в процессе репродукции человека мы постулировали два возможных механизма образования его во время эмбриогенеза – за счет атаки мочевой кислоты свободными радикалами кислорода, и исходя из предположения, что некоторые метаболические пути, утраченные организмом человека в процессе эволюции, могут рекапитулировать в эмбриональных тканях.

Цель данной работы – изучить роль аллантаина в эмбриональном и фетальном периоде развития человека, исследовать возможность определения аллантаина в сыворотке крови матери, как прогностического маркера, для ранней диагностики гипоксии плода и оценки особенностей течения беременности.

Задачи исследования:

1. Исследовать содержание аллантаина в фолликулярной жидкости и в ворсинках хориона эмбриона человека.
2. Изучить динамику содержания аллантаина и мочевой кислоты в сыворотке крови матери в течение беременности.
3. Определить интенсивность свободно-радикальных процессов в крови матери на разных неделях гестации и сравнить ее с содержанием аллантаина и мочевой кислоты.
4. При гипоксии плода исследовать в сыворотке крови матери содержание аллантаина, мочевой кислоты, хориогонического гонадотропина, альфафетопротеина и неконъюгированного эстриола.
5. Изучить возможность использования аллантаина в качестве прогностического маркера для оценки функционального состояния системы мать-плацента-плод.

Научная новизна. В работе впервые проведены многоплановые исследования с целью изучения роли аллантаина в процессе репродукции человека. Впервые показано накопление аллантаина в трофобласте (на 7-8 неделе гестации плода).

Впервые исследовано содержание аллантаина в сыворотке крови матери на разных неделях беременности и впервые показано, что уровень аллантаина достоверно повышен на протяжении всей беременности, при этом динамика накопления аллантаина претерпевает изменения. Максимальный пик концентрации аллантаина в крови беременных наблюдается в первом и втором триместре беременности (на 6-7 неделях развития плода).

Показано, что отношение аллантаин/мочевая кислота (А/МК) в сыворотке крови матери может отражать интенсивность свободно-радикальных процессов плода, и являться биомаркером окислительного стресса во время беременности. Впервые показано, что по содержанию аллантаина в сыворотке крови матери можно прогнозировать особенности течения беременности во втором и третьем триместре.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Содержание аллантаина (мкмоль/л) в сыворотке крови матери достоверно возрастает на всех сроках беременности.
2. Отношение аллантаин/мочевая кислота может служить информативным биомаркером в оценке гипоксии плода.

3. Аллантин во время беременности выполняет роль антиоксиданта, защищая плод от изменений интенсивности свободно-радикального окисления различных биомолекул в процессе развития.

4. Содержание аллантина в сыворотке крови при осложненном течении беременности повышается. Повышение аллантина стабилизирует пролиферативный фенотип трофобласта и свидетельствует о важной роли аллантина, направленной на сохранение плода.

Теоретическое и практическое значение работы. В теоретическом плане работа раскрывает новую роль аллантина в процессе эмбриогенеза человека. Показано, что увеличение аллантина в течение беременности происходит за счет возрастания уровня свободно-радикальных процессов и окисления ими мочевой кислоты в аллантине. Данные, представленные в работе, позволяют, как количественно, так и качественно, оценить значение аллантина как прогностического маркера в оценке развития плода. Выявлена возможность оценки гипоксии плода по количественному отношению уровня аллантина к мочевой кислоте. Увеличение концентрации аллантина в питательной среде при культивировании ворсинок хориона *in vitro* подтверждают гипотезу о том, что некоторые метаболические пути, утраченные организмом человека в процессе эволюции, могут рекапитулировать в эмбриональных тканях. Полученные результаты расширяют представления о биохимических процессах в процессе эмбрионального развития человека и открывают новые перспективы их практического применения в пренатальной диагностике плода.

Полученные в работе новые экспериментальные данные используются при чтении лекций в спецкурсах «Эмбриология человека», «Медико-генетическое консультирование», «Основы патобиохимии», «Генетика и биохимия окислительного стресса» на биолого-почвенном факультете ЮФУ.

Работа выполнена в рамках научной тематики НИИ биологии Южного федерального университета «Исследование молекулярных механизмов биологических эффектов аллантина» по программе Приоритетные направления развития науки, технологий и техники в Российской Федерации на период 2007-2009 гг., а также в рамках грантов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009-2012» по теме «Создание и апробация нового способа FIAV для быстрой идентификации аллельных вариантов генов», госконтракт № 02.740.11.5015 и «Разработка технологии мониторинга репродуктивной функции человека и развития плода с использованием новых геномных и постгеномных маркеров», госконтракт № 02.740.11.0501.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на научных сессиях биолого-почвенного факультета ЮФУ (2007, 2009, 2010); на заседании Ростовского отделения общества ВОГиС (2007, 2009); International Workshops and Scientific Discussion Club «New Technology in Integrative Medicine and Biology» (Bangkok-Pattaya, 2006); на XIV международной конференции «New Information Technologies in medicine, biology, pharmacology and ecology» (Гурзуф, 2006); на I съезде физиологов СНГ (Сочи-2005); на международной научно-практической конференции «Новая технологическая платформа биомедицинских исследований» (Ростов-на-Дону, 2007); на научно-практической конфе-

ренции «Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине» (Ростов-на-Дону, 2007), на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), на III Международной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2009).

Публикации результатов исследования. По теме диссертационного исследования опубликовано 12 работ, в том числе четыре из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения выводов, списка использованной литературы, включающего 50 отечественных и 139 зарубежных источника. Работа содержит 22 таблицы, иллюстрирована 11 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили образцы фолликулярной жидкости, полученные при проведении программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) из фолликулов 48 женщин, и лапароскопии – 12 женщин. Ворсинки хориона были взяты у абортусов на 7-8-ой неделе беременности. Содержание аллантоина в сыворотке крови на разных этапах гестации было изучено на 220 беременных и 30 небеременных женщин. Эффективность пренатального скрининга была оценена на 6447 беременных женщинах, проживающих в Ростовской области и проходивших пренатальный скрининг по сывороточным маркерам крови в первом (n=981) и во втором (n=5466) триместре беременности в 2006-2008гг. Материал для исследования был получен на базе «Центра репродукции человека и ЭКО» (Ростов-на-Дону) и клинико-диагностической лаборатории «Наука» (Ростов-на-Дону).

Аллантоин определяли методом высокожидкостной хроматографии (HPLC, BioRad) на колонке 4,6 x 250 мм, с носителем нуклеофила C-18. Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови определяли, используя набор реагентов «Ольвекс диагностикум» (Россия).

Определение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) плазмы крови в системе H_2O_2 – люминол. Регистрировали высоту быстрой вспышки (h) и светосумму (Sm) хемилюминесценции в течение 500 секунд. Интенсивность перекисного окисления липидов определяли по уровню малонового диальдегида (МДА) (Милютин Н.П. и др., 2008). Определение активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) (Fried R., 1975) и каталазы (Королюк М.А. и др., 1988). Определение суммарной пероксидазной активности (СПА) и получение липидных экстрактов вели по Бляу и Дайеру (Милютин Н.П., и др. 2008).

Содержание белка в гомогенатах тканей, в плазме и в суспензии эритроцитов определяли методом Лоури. Количество гемоглобина определяли гемоглобин-

цианидным методом. Определение сывороточных маркеров плода – альфафетопротеина (АФП), хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), неконъюгированного эстриола (НЭ) в крови беременных женщин в I и II триместрах и гормонов в фолликулярной жидкости проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе Alisei (Италия), используя тест-системы фирм «Алкор Био» (Россия) и «DRG» (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение содержания аллантина в фолликулярной жидкости и в ворсинках хориона эмбриона человека

Фолликулярная жидкость содержит значительное количество плазматических белков, выполняющих пластические функции, а также регуляторных белков, ферментов, гормонов, биоактивных веществ и факторов роста (Enien W. M. e.a., 1998). Мы исследовали уровень гормонов и аллантина в фолликулярной жидкости, аспирированной из преовуляторных фолликулов в момент их пункции по программе ЭКО на фоне индукции суперовуляции (1 группа) и в фолликулярной жидкости, аспирированной из фолликулов в момент диагностической лапароскопии при нормальном менструальном цикле (2 группа).

Результаты исследования гормонов в фолликулярной жидкости свидетельствуют об увеличении уровня фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тестостерона и стероидсвязывающего глобулина (ССГ) при суперовуляции и снижении уровня эстрадиола у пациенток второй группы (табл. 1). Не обнаружено достоверных различий в содержании аллантина в фолликулярной жидкости исследуемых групп. Содержание аллантина в фолликулярной жидкости зафиксировано нами, как очень низкое и регистрировалось в пределах от 0,1 до 0,8 мкмоль/л, и средняя концентрация в фолликулярной жидкости составляла $0,6 \text{ мкмоль/л} \pm 0,01$. Для изучения содержания аллантина в тканях эмбриона мы исследовали ворсинки хориона на 7-8 неделе беременности. В таблице 2 представлены данные о содержании аллантина и мочевой кислоты в ворсинках хориона (0 ч) и в культуральной среде (Хориокар-1) при выращивании ворсинок хориона (24 ч и 48 ч).

Таблица 1 – Содержание гормонов и аллантина в фолликулярной жидкости яичников на фоне суперовуляции (ЭКО) и без нее (лапароскопия)

Гормональный и аллантиновый профиль	1 группа ЭКО, n=48	2 группа лапароскопия, n=12	P
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), МЕ/л	3,4±0,17	2,8±0,12	<0,001
Пролактин, мМЕ/л	790,7±55,82	750,3±62,17	>0,05
Прогестерон, нмоль/л	222,6±21,15	204,5±34,12	>0,05
Эстрадиол, нмоль/л	6,9±0,72	11,4±0,65	<0,01
Тестостерон, нг/мл	9,8±0,51	6,1±0,48	<0,001
Стероидсвязывающий глобулин, нмоль/л	67,8±8,16	22,5±2,47	<0,001
Аллантин, мкмоль / л	0,6 ±0,01	0,7±0,05	>0,05

Как показали результаты наших исследований, содержание аллантиона в культуральной среде (0 ч) составляет $4,2 \pm 0,78$ мкмоль/л. При культивировании ворсинок хориона восьми недельных абортусов уже через 24 ч наблюдается повышение концентрации аллантиона более, чем в два раза ($8,92 \pm 1,9$ мкмоль/л), и через 48 ч содержание аллантиона в культуральной среде продолжает увеличиваться и достигает уровня $14,6 \pm 1,51$ мкмоль/л.

Таблица 2 – Показатели динамики концентраций аллантиона и мочевой кислоты в культуральной среде (Хориокар-1) при выращивании ворсинок хориона 8-ми недельных абортусов

Время культивирования (ч)	Контроль (содержание в среде Хориокар-1)	24 (n=14)	48 (n=14)
Аллантион, (мкмоль / л)	$4,2 \pm 0,78$	$8,92 \pm 1,9^{***}$	$14,6 \pm 1,51^{***}$
Мочевая кислота, (мкмоль / л)	$17,2 \pm 1,16$	$66,28 \pm 3,01^{***}$	$74,94 \pm 4,31^{***}$
Отношение аллантион/мочевая кислота, %	24,24	13,46	19,48

Примечание: *** – статистически достоверные результаты ($p < 0,001$), по отношению к контролю – «0 часов».

Таким образом, отмечено увеличение содержания аллантиона на 113 и 250 процентов через 24 и 48 ч соответственно. Данное увеличение содержание аллантиона, вероятно, можно рассматривать как механизм неферментативного пути атаки мочевой кислоты свободными радикалами. Поэтому мы исследовали содержание мочевой кислоты в культуральной среде при выращивании ворсинок хориона. При культивировании ворсинок хориона уровень мочевой кислоты через 24 ч составил $66,28 \pm 3,01$ мкмоль/л и через 48 ч составил $74,94 \pm 4,31$ мкмоль/л, что на 285 и 336% соответственно выше контрольных значений. Если бы прирост аллантиона осуществлялся за счет неферментативного пути, логично было бы регистрировать уменьшение содержания мочевой кислоты и увеличение отношения А/МК. В наших исследованиях мы наблюдали повышение концентрации мочевой кислоты и аллантиона одновременно. Поэтому мы предположили, что такое изменение может обеспечиваться не только за счет экзогенного притока аллантиона и атаки мочевой кислоты свободными радикалами, но и, возможно, за счет работы фермента уратоксидазы в эмбриональном периоде.

Динамика уровня аллантиона и мочевой кислоты в крови беременных женщин в зависимости от срока гестации

На рисунке 1 представлены данные о содержании аллантиона в сыворотке крови беременных женщин на разных неделях развития плода.

Уровень аллантиона в норме у здоровых женщин составил $11,27 \pm 2,67$ мкмоль/л. Ранее было показано, что концентрация аллантиона у здоровых людей не зависит от пола и возраста и регистрируется в пределах 8-15 мкмоль/л (Iris F.F., 1999; Yardim-Akaydin S. e.a., 2004).

Как видно из представленных результатов, уровень аллантиона в сыворотке крови беременных женщин претерпевает существенные изменения в течение

беременности. Максимальный пик концентрации аллантаина в крови беременных наблюдается на 6-7 неделе гестации и составляет $30,62 \pm 5,54$ мкмоль/л, что практически в 3 раза больше по сравнению с контролем. На 10-14 неделях происходит понижение содержания аллантаина в сыворотке до $23,77 \pm 4,60$ мкмоль/л. С 15 по 18 неделю наблюдается вновь повышенные концентрации аллантаина, и она составляет $27,62 \pm 3,72$ мкмоль/л. Возможно, это связано с его биологически активными свойствами, в частности, антиоксидантными. Начиная с 19 недели, нами отмечено достоверное снижение концентрации аллантаина в сыворотке крови на 49% по отношению к уровню аллантаина на 7 неделе беременности и на 43% по отношению к 15-18 неделям гестации. В течение последующих недель происходит повышение содержания аллантаина в сыворотке крови и его уровень достигает $22,65 \pm 3,87$ мкмоль/л.

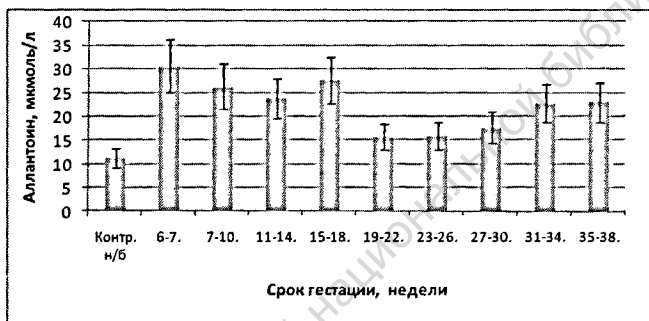


Рисунок 1 – Содержание аллантаина (мкмоль/л) в сыворотке беременных женщин на разных сроках гестации

Мы предполагаем, что значительное накопление аллантаина в сыворотке беременных женщин связано с его плодным происхождением. Вероятно, именно в этот период происходит максимальная активация уриказы, образующей аллантаин, который, обладая анаболическим, антиоксидантным и антимутагенным эффектами (Гуськов Е.П. и др., 2001, 2004) обеспечивает значительный рост плода, наблюдаемый во втором триместре, и осуществляет его защиту от патогенных воздействий.

Пул аллантаина в организме человека складывается из его экзогенного поступления с пищевыми продуктами и эндогенного неферментативного образования, получаемого при окислении мочевой кислоты активными кислородными метаболитами. Поэтому следующим этапом нашей работы было исследование содержания мочевой кислоты на тех же сроках гестации. Результаты представлены на рисунке 2.

Как видно из представленных результатов, уровень мочевой кислоты в норме у небеременных здоровых женщин составляет $252,21 \pm 15,23$ мкмоль/л, что согласуется с данными литературы (Toescu V., Nutall S.L., 2002). У беременных женщин уровень мочевой кислоты в сыворотке крови уменьшается в первом триместре на 23% с последующим повышением во втором триместре до кон-

трольного уровня, а затем в третьем триместре постепенно увеличивается и возрастает на 43% к концу беременности по сравнению с контролем.

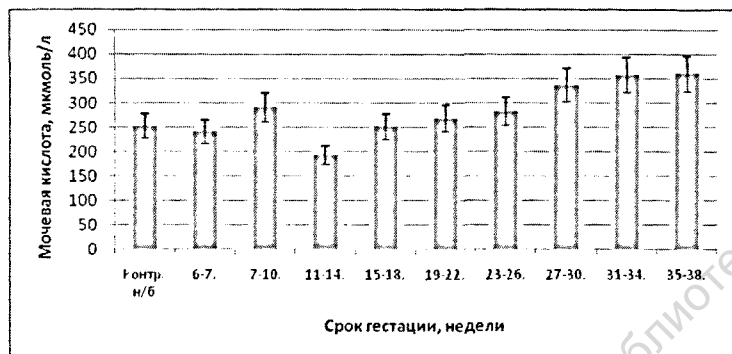


Рисунок 2 – Содержание мочевой кислоты (мкмоль/л) в сыворотке крови беременных женщин на разных сроках гестации

Мочевая кислота, являясь активным поглотителем свободных радикалов, предотвращает дальнейшее окисление жизненно важных молекул, например, белков и жиров. На ранних стадиях беременности концентрация мочевой кислоты понижается за счет повышенного расщепления. Напротив, в конце беременности концентрация мочевой кислоты повышается за счет ускорения катаболизма. Одним из механизмов увеличения пула мочевой кислоты, может быть, «выключение» гена уриказы, сопровождающиеся уменьшением содержания аллантоина и соответственно увеличением мочевой кислоты. Достоверное увеличение мочевой кислоты на поздних сроках беременности, вероятно, эволюционно связано с тем, что в данный период происходит формирование коры головного мозга плода. Ранее была высказана гипотеза, что мочевая кислота может выступать в роли стимулятора мозговой активности. В своей статье Э. Орван указал, что наши родственники, приматы, лишены фермента уриказы, который у прочих млекопитающих расщепляет мочевую кислоту до аллантоина. В связи с этим, мозг приматов испытывал на себе стимулирующее влияние мочевой кислоты, что и могло во многом предопределить дальнейшее появление разумных существ именно в этой ветви эволюции позвоночных (Ogovan E., 1955).

В последнее время появляется все больше данных о том, что отношение А/МК может являться биомаркером окислительного напряжения, то есть с увеличением окислительного стресса уровень аллантоина повышается из-за повышения «окислительного обмена» мочевой кислоты (Iris F.F. с.а., 1999). На рисунке 3 представлены результаты исследования динамики изменения А/МК в сыворотке крови женщин на разных сроках беременности.

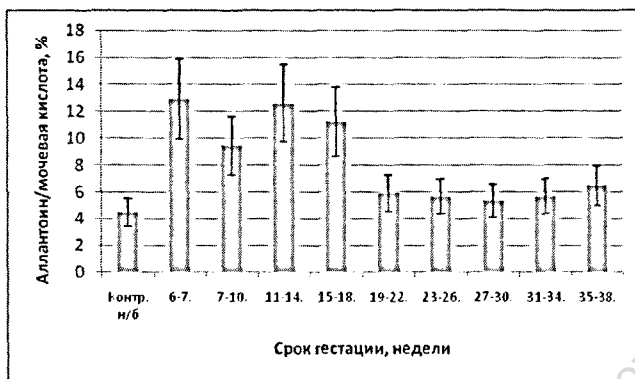


Рисунок 3 – Отношения количества аллантоина к мочевой кислоте (%) в сыворотке беременных женщин на разных сроках гестации

Результаты исследования показывают, что у небеременных женщин уровень отношения А/МК находится в пределах $4,48 \pm 0,6\%$. У беременных женщин с первых дней и по 14 неделю беременности наблюдается высокий уровень отношения количества А/МК, который составляет $12,58 \pm 3,28\%$, что в три раза выше, чем у небеременных. Это может быть связано как с низким антиоксидантным статусом, так и с увеличенным окислительным стрессом, из-за большой нагрузки на организм матери во время беременности. К 19 неделе наблюдается резкий спад отношения А/МК до уровня, значение которого $5,9 \pm 1,46\%$ приближается к значению у небеременных женщин – $4,48 \pm 0,6\%$, но не достигает его. Начиная с 34 недели, отношение аллантоина к мочевой кислоте снова повышается до $6,49 \pm 1,26\%$. Проблема участия аллантоина в реакции материнского организма на развивающуюся ткань плода представляет особый интерес, одним из элементов которого является сопоставление концентраций аллантоина, А/МК и интенсивности свободно-радикальных процессов. Для определения уровня свободно-радикального окисления и соотношения про- и антиоксидантных систем в плазме и сыворотке крови исследовали интенсивность H_2O_2 -люминолзависимой хемилюминесценции.

Интенсивность H_2O_2 -люминолзависимой хемилюминесценции в плазме беременных женщин в зависимости от уровня гестации

В наших экспериментах был использован метод индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) в системе H_2O_2 – люминол. Люминол относят к химическим активаторам ХЛ, он реагирует со свободными радикалами с образованием возбужденных молекул. Люминол, не обладая побочными цитотоксическим действием и фотоэффектами, дает при окислении высокий квантовый выход (Fritzsch R., De Weck A.L., 1988). Ввиду того, что при окислительном стрессе образуются различные активные формы кислорода, нами был выбран люминол, обладающий неспецифической реакционной способностью. Механизм H_2O_2 -индуцированной хемилюминесценции образцов тканей основан на взаимодей-

ствии H_2O_2 с прооксидантными компонентами, в первую очередь, с железосодержащими компонентами, что приводит к образованию активных форм кислорода, таких как: гидроксид-радикал, синглетный кислород и супероксиданион-радикал. Это может вызвать активацию свободно-радикальных процессов (СРП), ведущих к образованию перекисных радикалов, рекомбинация которых сопровождается высвечиванием кванта света. Установлено также прямое участие синглетного кислорода в хемилюминесценции, индуцированной H_2O_2 . При этом амплитуда (высота) вспышки ХЛ (Н), индуцированной H_2O_2 , характеризуется резистентностью тканей к перекисному окислению. Величина ее прямо пропорциональна окисляемости тканевых липидов и концентрации металлов переменной валентности и обратно пропорциональна содержанию природных антиоксидантов в исследуемом биосубстрате. Светосумма ХЛ (Sm) отражает скорость расходования свободных радикалов липидной природы в результате их взаимодействия с антиоксидантами за 100 сек. Светосумма ХЛ обусловлена в первую очередь уровнем прооксидантов в системе, а влияние антиоксидантных компонентов носит вторичный характер. В нашем эксперименте мы изучали изменение интенсивности ХЛ по величине быстрой вспышки (Н) и светосуммы (Sm 100сек) в плазме крови беременных и небеременных женщин. Данные представлены на рисунке 4.

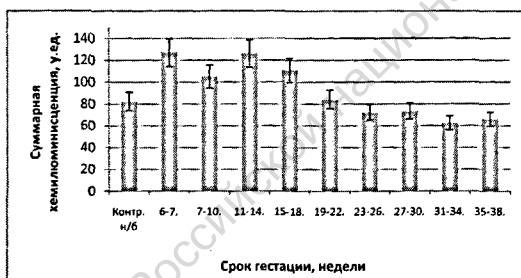


Рисунок 4 – Суммарная хемилюминесценции (Sm 100 секунд, у.ед.) в плазме беременных женщин на разных сроках гестации

Полученные данные показывают, что в первом триместре интенсивность свободно-радикальных процессов (СРП) достоверно увеличена и составляет в среднем $119,5 \pm 12,71$ у.ед. Во втором и третьем триместрах его уровень падает в среднем до $89,2 \pm 8,26$ и $67,4 \pm 7,69$ у.ед. соответственно и достигает уровня, характерного для небеременных здоровых женщин. К 10-13 недели беременности устанавливается новый стационарный уровень обменных процессов: на фоне резкого увеличения пула аллантаина в крови активность свободно-радикальных процессов падает даже ниже контрольного уровня.

На рисунке 5 представлены результаты динамики А/МК в плазме крови беременных женщин и интенсивности СРП. Нами выявлены однонаправленные

изменения между отношением аллантиона к мочевой кислоте и интенсивностью свободно-радикальных процессов. Это отражается в резком возрастании уровня свободно-радикальных процессов и как адаптивный механизм – увеличении содержания антиоксидантов, в частности, аллантиона, в крови матери за счет свободно-радикальной деструкции мочевой кислоты. Это еще раз подчеркивает, что отношение А/МК может служить биомаркером окислительного стресса во время беременности человека. Роль свободных радикалов в процессе эмбриогенеза связана с быстрым ростом и развитием эмбриона. Алексей Оловников считает, что в процессе эмбриогенеза в зародыше накапливается большое количество свободных радикалов, которые играют роль «распаковывающих агентов» (Оловников А.М, 1996).

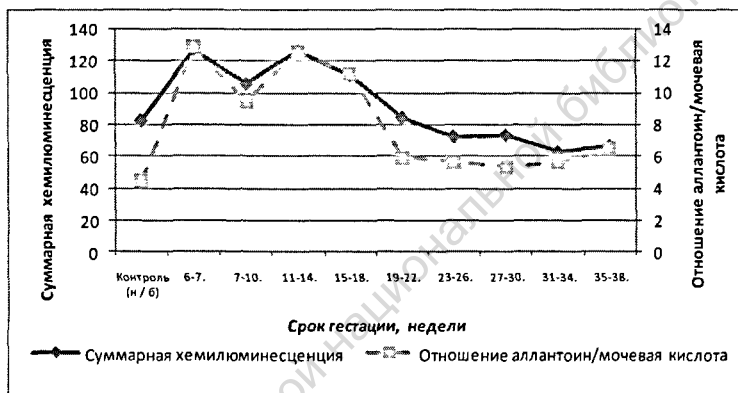


Рисунок 5 – Динамика изменения отношения аллантион: мочевая кислота и суммарная хемилюминесценция у беременных женщин на разных сроках гестации

Динамика уровня аллантиона и мочевой кислоты в крови беременных женщин при гипоксии плода

Содержание аллантиона и мочевой кислоты, а также их отношение А/МК определяли у женщин с гипоксией плода на 15-18 неделе беременности. Группа женщин с гипоксией плода (группа 1) была сформирована на основании биохимических показателей функциональной системы мать-плацента-плод, включающих интенсивность свободно-радикальных процессов (ХЛ, МДА, СПА, внеэритроцитарный гемоглобин – ВЭГ), уровень антиоксидантного статуса (СОД, каталаза), а также хориогонический гонадотропин, свободный эстриол и альфафетопротеин (Бурлев В.А., 1992; Крайнова Н.Н. и др., 1998; Ong С.У. с.а., 2000).

Как видно из таблицы 3, в первой группе женщин наблюдалась резкая активация начальных стадий свободно-радикального окисления по сравнению с группой 2, у которых эти показатели были в пределах физиологической нормы. Параметры хемилюминесценции в первой группе превышали норму в 3-7 раз

(индивидуальные траектории), что указывает на мощную генерацию цитотоксических активных форм кислорода. Уровень промежуточного продукта перекисного окисления липидов МДА – в плазме повышался более чем на 50 процентов, а в эритроцитах на 14%. Интенсификация свободно-радикальных процессов приводит к резкому нарушению стабильности мембран эритроцитов (ВЭГ, СПА). Активация свободно-радикального окисления происходит на фоне повышенной активности СОД и каталазы, что указывает на недостаточную емкость антиоксидантной системы. Таким образом, у женщин данной группы наблюдался выраженный окислительный стресс, приводящий к гипоксии плода.

Таблица 3 – Биохимический профиль сывороточных маркеров в крови матери на 15-18 неделе беременности при гипоксии плода

Наименование	Группа 1 (Гипоксия)	Группа 2 (Контроль)
Хемилюминесценция плазмы, отн. ед	↑ Н 143±4,6 Sm 473±3,8	Высота (Н) 23±1,0 Светосумма (Sm) 74,2±2,4
Малоновый диальдегид Эритроциты: нмоль/мг Нб; Плазма: нмоль/мл	Эритроциты: 3,96 ↑ Плазма: 45,87	Эритроциты: 3,0±0,7 Плазма: 20,92±3,08
СПА, Ед/мл	↑ 3,55±0,34	1,58±0,26
ВЭГ, мкМ/л	↑ 4,30±0,23	3,5±0,42
СОД, ЕдАк/мг Нб	↓ 2,75±0,17	3,17±0,39
Каталаза Эр -нМ Н202 мг Нб Плазма – нМ Н202 мг Нб	↓ Эритроциты: 22,12 ↓ Плазма – 8,74	Эритроциты: 31,0±4,1 Плазма: 31,0±4,1
ХГЧ, МЕ/л	↓ 14100±535	35971±654
АФП, мкг/мл	47,1±0,76	45,4±0,70
ИЭ, нг/мл	2,7±0,06	2,3±0,05
Мочевая кислота, мкмоль/л	↓ 223,7±22,74	254,3±22,74
Аллантоин, мкмоль/л	↑ 36,4±1,42	27,6± 3,72
А/МК x100%	↑ 16,2± 0,47	10,8±0,85

Биохимические показатели интенсивности свободно-радикальных процессов и уровень гормонов плода в группе женщин с гипоксией плода имели широкий индивидуальный размах варьирования изучаемых параметров, поэтому мы применили факторный анализ по выделению главной компоненты. Результаты факторного анализа позволили нам предположить, что изменения содержания хориогонического гонадотропина и отношения аллантоина к мочевой кислоте являются наиболее значимыми при оценке гипоксии плода. На первый фактор приходилось 57,2% дисперсии, при этом индивидуальные однонаправленные изменения были зарегистрированы в содержании уровня ХГЧ и аллантоина. Далее мы рассмотрели направленность изменений содержания ХГЧ, аллантоина, мочевой кислоты и отношения содержания аллантоина к мочевой кислоте у беременных женщин с гипоксией плода на 15-18 недели беременности (табл. 4, 5, 6).

Как видно из представленных результатов в группе женщин с гипоксией плода и пониженном уровне хорионического гонадотропина половина женщин (51%) имела содержание аллантоина и мочевой кислоты в пределах нормы. В остальных случаях была зарегистрирована разнонаправленная динамика изме-

нений, при этом более чем в 20% случаях уровень аллантиона был снижен, а содержание мочевой кислоты регистрировалось в пределах нормы (табл. 4-6).

Таблица 4 – Динамика изменения аллантиона (мкмоль/л) при пониженном ХГЧ (0,3-0,4 МОМ) и концентрации мочевой кислоты в пределах референсных значений в сыворотке крови беременных (15-18 недель) при гипоксии плода

Количество беременных (абс/отн)	75 (51%)	9 (6%)	31 (21%)
	↓ ХГЧ, N-A, N-Mк	↓ ХГЧ, ↑-A, N-Mк	↓ ХГЧ, ↓-A, N-Mк
Содержание мочевой кислоты (мкмоль/л)			
M±m	254,30±22,74	263,30±16,36	253,70±26,02
Содержание аллантиона мкмоль/л			
M±m	27,53±1,36	38,26±3,82 ↑	17,72±2,19 ↓
A/MK x 100%			
M±m	10,88±0,85	14,56±0,35 ↓	7,05±1,05 ↓

Таблица 5 – Динамика изменения аллантиона (мкмоль/л) при пониженном ХГЧ (0,3-0,4 МОМ) и повышенной концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови беременных (15-18 недель)

Количество беременных (абс/отн)	6 (4%)	14 (10%)
	↓ ХГЧ, ↑-A, ↑-Mк	↓ ХГЧ, ↓-A, ↑-Mк
Содержание мочевой кислоты мкмоль/л		
M±m	359,90±25,61 ↑	364,90±19,05 ↑
Содержание аллантиона (мкмоль/л)		
M±m	32,46±1,34 ↑	17,55±3,07 ↓
A/MK x 100%		
M±m	9,05±1,1	4,82±0,59 ↓

Таблица 6 – Динамика изменения аллантиона (мкмоль/л) при пониженном ХГЧ (0,3-0,4 МОМ) и пониженной концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови беременных (15-18 недель) с гипоксией плода

Количество беременных (абс/отн)	7 (5%)	4 (3%)
	↓ ХГЧ, N-A, ↓-Mк	↓ ХГЧ, ↑-A, ↓-Mк
Содержание мочевой кислоты мкмоль/л		
M±m	180,15±8,57 ↓	186,50±7,89 ↓
Содержание аллантиона (мкмоль/л)		
M±m	25,27±1,65	40,75±1,65 ↑
A/MK x 100%		
M±m	14,04±0,89 ↑	21,87±1,50 ↑

Особенности течения беременности у женщин во втором и третьем триместре, с выявленным повышенным уровнем А/МК

Для оценки эффективности аллантиона, как прогностического маркера течения беременности собрали и изучили информацию о течении и ведении беременности у 27 женщин с повышенным уровнем А/МК во втором и третьем триместре (1 группа) и у 48 женщин с уровнем А/МК в пределах референсных значений (2 группа), беременность которых закончилась родами (табл. 7).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у женщин с повышенным уровнем А/МК во втором триместре беременности достоверно чаще реги-

стрировался гестоз второй половины беременности, а в третьем триместре фетоплацентарная недостаточность (ФПН). Одной из причин такого повышения аллантиона у женщин с гестозом и ФПН может быть то, что повышенный уровень аллантиона стабилизирует пролиферативный фенотип трофобласта, препятствуя его дифференцировке в инвазивный фенотип. Это в свою очередь ведет к недостаточной инвазии трофобласта спиральной артерии, нарушению их гестационной перестройки и развитию гестоза и ФПН.

Таблица 7 – Осложнения течения беременности у женщин с повышенным уровнем А/Мк

Патология беременности	1 группа	2 группа
Второй триместр		
Угрожающее прерывание беременности	1 (3,7%)	2 (4,1%)
Гестоз второй половины беременности	10 (38,3%)	7 (14,5%)
Анемия беременных	4 (14,8%)	6 (12,5%)
Третий триместр		
Угрожающие преждевременные роды	1 (3,7%)	3 (6,25)
Фетоплацентарная недостаточность	6 (22,9%)	4 (8,3%)
Анемия беременных	1 (3,7%)	5 (10,2%)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования показали, что уровень аллантиона в сыворотке крови беременных женщин, будучи втрое выше этого показателя у небеременных женщин, претерпевает существенные изменения в течение всей беременности. Наиболее существенное повышение содержания аллантиона отмечается на 7 неделе беременности. Во втором триместре беременности отмечен также повышенный уровень. В третьем триместре концентрация аллантиона значительно снижается, приближаясь к уровню у небеременных женщин. Повышение аллантиона во время беременности отмечено у других млекопитающих, в частности было показано, что уровень аллантиона повышается в амниотической жидкости крыс на 21 день беременности и сохраняется повышенным в сыворотке крови во время вскармливания потомков, в течение 20 дней после родов (Morgan E.H., Hanson A., 1964). У крыс и других млекопитающих, за исключением приматов, имеется фермент – уриказа, в результате деятельности которого образуется аллантион. Увеличение аллантиона во время беременности у грызунов можно объяснить увеличением экспрессии гена уриказы. Однозначно ответить на вопрос о происхождении аллантиона в сыворотке крови беременных женщин в настоящее время не представляется возможным, однако мы предполагаем, что значительное накопление аллантиона в сыворотке беременных женщин связано с его плодным происхождением. Вероятно, именно в этот период происходит максимальная активация уриказы, образующей аллантион, который,

обладая анаболическим, антиоксидантным и антимуtagenным эффектами (Гуськов Е.П. и др., 2004), обеспечивает значительный рост плода, наблюдаемый во втором триместре, и осуществляет его защиту от патогенных воздействий. Полученные нами результаты о содержании аллантиона в ворсинках хориона и сыворотке крови матери ставят несколько вопросов, главные из которых – происхождение аллантиона и его физиологическое значение при беременности. Факт достоверного повышения уровня аллантиона при выращивании ворсинок хориона и на 7-8 неделе гестации подтверждает наше предположение об индукции синтеза аллантиона на ранних сроках беременности. С другой стороны, 6-8 недель – это период первой волны инвазии цитотрофобласта в эндометрий, сопровождающийся бурными пролиферативными процессами. И, вероятно, аллантион определенным образом причастен к этим явлениям.

Ранее было показано, что патологические процессы, лежащие в основе плацентарной недостаточности, сопровождаются развитием окислительного стресса в тканях плаценты (Бурлев В.А., 1992; Кеня М.В. и др., 1993; Колесникова Л.И., 1993; Wang Y., Walsh S.W., 1996; Multi-Turkoglu U. e.a., 1998; Poranen A.K. e.a., 1998; Walker J.J., 1998). Кроме того, выявлено накопление мочевой кислоты в тканях плаценты при развитии плацентарной недостаточности (Саллум А. и др., 2004). Увеличение содержания аллантиона и отношения А/МК у женщин с гипоксией плода и развитием фетоплацентарной недостаточности возможно связано с изменением окислительного статуса на более ранних этапах беременности, когда происходит первая (6-8 неделя) и вторая волна (16-18 неделя) инвазии.

Возможно, повышение аллантиона, как антиоксиданта, приводит к блокированию кислород-зависимой дифференцировки трофобласта в синцитиотрофобласт и его инвазии. Повышение аллантиона стабилизирует пролиферативный фенотип трофобласта, препятствуя его дифференцировке в инвазивный фенотип. Это, в свою очередь, ведет к недостаточной инвазии трофобласта спиральной артерии, нарушению их гестационной перестройки и развитию фетоплацентарной недостаточности и гестозов.

Обнаруженное нами повышение содержания аллантиона в крови и тканях трофобласта беременных позволяет выдвинуть ряд гипотез, требующих дальнейшего подтверждения временной экспрессии Uox-гена в ткани плаценты и печени эмбрионов. Не исключено существование механизмов накопления аллантиона в организме беременных за счет регуляции его почечной реабсорбции и секреции. Возможно наличие пути синтеза аллантиона у плода из мочевины и глюкoxилата (обращение реакции гидролиза аллантионовой кислоты).

Несмотря на то, что организм человека не способен синтезировать аллантион, резкое увеличение его концентрации в плаценте (трофобласте) свидетельствует о его протекторной функции у развивающегося плода. В процессе эмбриогенеза из-за внешних и внутренних факторов, изменяющих метаболизм материнского организма, могут возникать состояния гипероксической гипоксии у плода, повышающие уровень свободно-радикальных процессов. В этой ситуации трофобласт, насыщенный аллантином, играет роль антиоксидантного и антимуtagenного фильтра, защищающего внутреннюю среду плода.

ВЫВОДЫ

1. Содержание аллantoина в фолликулярной жидкости регистрируется в пределах от 0,1 до 0,9 мкмоль/л, и его средняя концентрация в норме составляет $0,7 \pm 0,05$ моль/л. При культивировании ворсинок хориона восьминедельных абортусов наблюдается повышение концентрации аллantoина в культуральной среде на 113% и 250% через 24 и 48 ч соответственно.

2. Содержание аллantoина в сыворотке крови матери достоверно увеличено на всех этапах гестации, при этом в первом триместре на 6-8 неделе он практически втрое превышал контрольные значения и его уровень составлял $30,62 \pm 5,54$ мкмоль/л, к концу беременности его уровень также достоверно отличался от контроля, на 38 неделе он составлял $22,96 \pm 3,68$ мкмоль/л и превышал контроль вдвое. Содержание мочевоы кислоты в сыворотке крови матери возрастает на протяжении беременности, достигая максимальных значений к концу третьего триместра.

3. В первом триместре интенсивность свободно-радикальных процессов, оцениваемая по уровню индуцированной хемиллюминесценции достоверно увеличивается и Sm ХЛ составляет в среднем $119,5 \pm 12,71$ у.е. Во втором и третьем триместрах светосумма ХЛ медленно снижается, достигая практически контрольных значений к концу беременности. Интегральный показатель отношения содержания аллantoина к мочевоы кислоте и светосумма ХЛ имеют однонаправленные изменения в процессе эмбрионального развития человека.

4. Снижение хориогонического гонадотропина до 0,3-0,4 МОМ и увеличение отношения аллantoин/мочевоы кислота выше 16% во втором триместре беременности достоверно прогнозируют развитие гипоксии плода.

5. Доказано увеличение аллantoина у женщин с гестозами второго триместра и с фетоплацентарной недостаточностью в третьем триместре.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дронова, М.А. Ретроспективный клинико-генеалогический анализ привычного невынашивания беременности / С.С. Амелина, Г.Г. Гуревич, С.В. Ломтева, Е.К. Тимолянова // Перинатология и неонатология: Сборник научно-практических работ. – М.:, МОНИИАГ.- 1989. – С. 8-12.
2. Гуськов, Е.П. Аллantoин, окислительный стресс и беременность / Е.П. Гуськов, В.Н. Прокофьев, С.В. Ломтева // Научные труды I съезда физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, 2005. – Т. 2. – С. 135.
3. Кузьмин, А.В. Способ прогнозирования исходов программы ЭКО И ПЭ / А.В. Кузьмин, В.И. Орлов, К.Ю. Сагамонова, Е.А. Ефанова, Е.Н. Ермоленко, С.В. Ломтева // Эмбрион человека как клинический и лабораторный объект: Международная конференция / Приложение к журналу «Вестник Уральской медицинскоы академической науки». – Екатеринбург, 2005. – С. 46.
4. Шестопалов, А.В. Биологические функции аллantoина / А.В. Шестопалов, Т.П. Шкурат, З.И. Микашинович, И.О. Крыжановская, М.А. Богачева, С.В.

- Ломтева, В.Н. Прокофьев, Е.П. Гуськов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2006. – № 5. – С. 541-545.
5. Шестопалов, А.В. Аллантоин – биологические свойства и функции / А.В. Шестопалов, Т.П. Шкурат, З.И. Микашинович, И.О. Крыжановская, М.А. Богачева, С.В. Ломтева, В.Н. Прокофьев, Е.П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – № 6. – С. 586-591.
 6. Прокофьев, В.Н. Исследование аллантоина при опухолевых процессах / В.Н. Прокофьев, И.О. Покуднина, Е.В. Чистякова, А.А. Родионов, С.В. Ломтева, Е.П. Гуськов // Новая технологическая платформа биомедицинских исследований: Материалы научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2006. – С. 20-21.
 7. Прокофьев, В.Н. Аллантоин, мочевая кислота и канцерогенез / В.Н. Прокофьев, И.О. Покуднина, Е.В. Чистякова, А.А. Родионов, С.В. Ломтева, Е.П. Гуськов // New technology in integrative medicine and biology». «Stress and extreme conditions: Proceedings of international scientific interdisciplinary workshop. – Thailand (Bangkok-Pattaya), 2006. – С. 62.
 8. Ломтева, С.В. Роль аллантоина при физиологической и патологической беременности / С.В. Ломтева, В.Н. Прокофьев // Естествознание и гуманизм: современный мир, природа и человек: Межвузовский сборник научных трудов. – Томск, 2007. – Т. 4. – № 3. – С. 14-15.
 9. Ломтева, С.В. Аллантоин как биомаркер при физиологической и патологической беременности / С.В. Ломтева, В.Н. Прокофьев // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине: Материалы научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2007. – С. 46-47.
 10. Ломтева, С.В. Аллантоин и нормальная беременность / С.В. Ломтева, Л.В. Гутникова, В.Н. Прокофьев, Е.П. Гуськов // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск, 2008. – С. 402.
 11. Александрова, А.А. Роль аллантоина в процессах репродукции / А.А. Александрова, Т.П. Шкурат, С.В. Ломтева, К.В. Азарин, В.А. Чистяков // Валеология. – 2008. – № 4. – С. 32-36.
 12. Гутникова, Л.В. Исследование эффективности пренатального скрининга в первом триместре беременности / Л.В. Гутникова, А.А. Александрова, С.В. Ломтева, Е.А. Данько, Е.В. Машкина, Т.П. Шкурат // Валеология. – 2009. – № 3. – С. 28-34.

2010.7

10 - 19795 / 19795

Из фондов Российской национальной библиотеки